

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Off nlegungsschrift**
⑩ **DE 198 29 944 A 1**

⑤1 Int. Cl.7:
G 02 B 21/16
G 02 B 21/00

⑦1 Aktenzeichen: 198 29 944.3
⑦2 Anmeldetag: 4. 7. 1998
⑦3 Offenlegungstag: 5. 1. 2000

DE 198 29 944 A 1

⑦1 Anmelder:
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

⑦2 Erfinder:
Wiederhöft, Holger, Dipl.-Biol., 07743 Jena, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 41 11 903 A1
US 50 34 613

Mitteilungen für Wissenschaft und Technik,
Bd.II, Nr.1, Juni 1995, S.9-19;

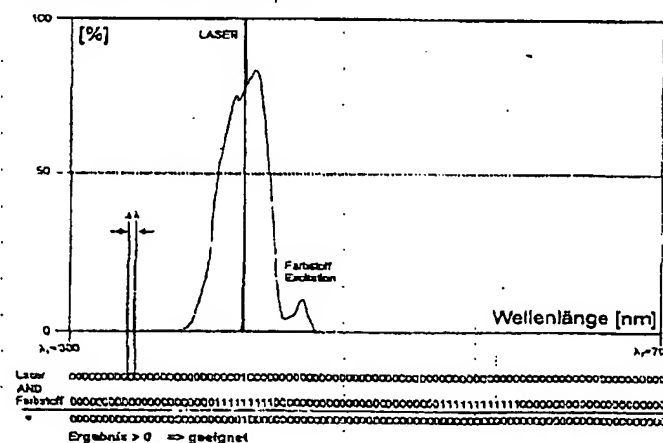
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verfahren und Anordnung zur Gerätekonfiguration von konfokalen Mikroskopen

⑥7 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gerätekonfiguration von konfokalen Mikroskopen, vorzugsweise von Laser-Scan-Mikroskopen, bei denen Laserlicht mit einer oder mehreren Spektrallinien erzeugt und auf eine Probe (16) gerichtet wird, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthält oder auf die ein Fluoreszenzfarbstoff aufgebracht ist.

Dabei werden die Excitationswellenlängen und die Emissionswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in getrennten Datensätzen erfaßt und diese in einem Datenspeicher (34) abgelegt. Ebenso werden die mit dem Mikroskop einstellbaren Laserspektren, die auf die Probe (16) zu richten sind, und die mit den vorhandenen Filtern erzielbaren Transmissionsspektren in Datensätzen erfaßt und diese Datensätze gespeichert.

Aus einer rechnerischen Verknüpfung dieser Datensätze werden Vorgaben für die Konfiguration des Mikroskops ermittelt.



DE 198 29 944 A 1

DE 198 29 944 A 1

1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gerätekonfiguration von konfokalen Mikroskopen, vorzugsweise von Laser-Scan-Mikroskopen, bei denen Laserlicht mit einer oder mehreren Spektrallinien erzeugt und auf eine Probe gerichtet wird, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthält oder auf die ein Fluoreszenzfarbstoff aufgebracht ist, wobei das von der Probe reflektierte und/oder emittierte Licht einer Bildauswertung zugrunde gelegt und die Qualität der Bildauswertung beeinflusst wird, indem Filter oder Filterkombinationen in den Mikroskopstrahlengang eingebracht werden, die der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes entsprechen. Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf eine Anordnung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Die Konfokalmikroskopie bietet als spezielle Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie die Möglichkeit, nicht nur Mikrostrukturen höher aufzulösen, sondern diese auch in der Z-Koordinate des Raumes abzubilden und zu vermesen. Das hat dazu geführt, daß neben den klassischen Kontrastverfahren Hellfeld, Phasenkontrast und Interferenzkontrast zunehmend die Fluoreszenztechnik in den Mittelpunkt des Interesses des optischen Feingerätebaus und der Wissenschaft gerückt ist.

Bei der Fluoreszenztechnik wird davon ausgegangen, daß unterschiedliche Fluorochrome, deren Anregungs- und Emissionswellenlängen in verschiedenen spektralen Bändern liegen, die Darstellung von Strukturen gleichzeitig in mehreren Farben erlauben. So können in Abhängigkeit von den spektralen Eigenschaften verschiedener Farbstoffmoleküle neben morphologischen Informationen auch Aussagen über physiologische Parameter gewonnen werden.

Wird das Konfokalmikroskop für fluorometrische Verfahren genutzt, lassen sich Aufschlüsse über Veränderungen der Konzentration von Ionen und Molekülen ableiten. Dabei sind auch Indikatoren von Bedeutung, die zusätzlich zur Intensitätsabhängigkeit eine Verschiebung des Anregungs- oder Emissionsspektrums zeigen und insofern eine Quantifizierung von Ionenkonzentrationen ermöglichen. Als Beleuchtungsquellen werden einzelne Laser mit jeweils einer Wellenlänge oder auch "Multi-Line"-Mischgaslaser mit mehreren nutzbaren Wellenlängen verwendet.

Eine derartige Verfahrensweise einschließlich der zugehörigen Gerätetechnik ist in den "Mitteilungen für Wissenschaft und Technik", Band II, Nr. 1, Seiten 9-19, Juni 1995 beschrieben. Hier ist ausführlich dargelegt, daß entsprechend den im Beleuchtungspfad durchgeführten Maßnahmen zur punktgenauen Objektbeleuchtung mit verschiedenen Anregungswellenlängen in umgekehrter Richtung auch das Design des Detektionssystems der Emissionswellenlänge angepaßt sein muß. Dabei kommt es darauf an, die spektral unterschiedlichen Informationen aus genau demselben Bereich einer Probe zu detektieren und diese pixelgenau zu registrieren und für die Bildauswertung bereit zustellen. Nur dadurch ist die Aufnahme von 3D-Datensätzen möglich, die z. B. eine zuverlässige Zuordnung von räumlichen Zell- oder Gewebestrukturen innerhalb der Mikroarchitektur oder die Lokalisation mehrerer Genorte in Chromosomen erlauben.

Für sequenzielle Detektionen, beispielsweise bei der Auswertung von Reflexionen und emittierter Strahlung beim Fluoreszenzverfahren, werden als Anregungsstrahlenteiler im konfokalen Strahlengang Neutralteiler und einfachdichroitische Teilerspiegel verwendet, wobei ein Teilerwechsel zwischen aufeinanderfolgenden Aufnahmen erforderlich ist. Zur Begrenzung der detektierten Emissionsbänder werden beispielsweise Sperrfilter genutzt, wobei wahlweise Langpass- und Bandpassfilter zur Feinabstimmung der spektralen

2

Trennung eingesetzt werden können.

Alle Filterkomponenten sind dabei in motorisierten Filterrädern montiert und stehen bei entsprechender Ansteuerung durch Austausch gegeneinander bereit.

Die Aufzweigung des Emissionslichtes in mehrere Detektionskanäle hat zwar den Vorteil, daß für alle Detektoren Beleuchtungs- und Detektionslochblenden exakt konfokal angeordnet sind, jedoch erhöht sich mit der Anzahl der Detektionskanäle die Anzahl der möglichen Filterkombinationen. Das hat zur Folge, daß ein Anwender des Konfokalmikroskops von einem Fluoreszenzfarbstoff exakt die Anregungs- und Emissionswellenlänge kennen muß, um mit dem Mikroskop ein Bild der Probe bzw. das Bild einer ausgewählten Ebene der Probe erstellen zu können.

Die Erfindung nutzt beispielsweise den Effekt, demzufolge die mit der Anregungswellenlänge in den Farbstoff eingestrahlte Energie in der Folge in eine Wellenlänge niedrigerer Energie transformiert und wieder vom Farbstoff abgestrahlt wird. Dabei gelangen die Emissionsphotonen über die bereits beschriebenen Spiegel, Filter und Farbteiler in den jeweiligen Detektionskanal und dort zu einem Photomultiplier (PMT), der sie detektiert, registriert und einer Bildverarbeitung zur Verfügung stellt.

Dabei ist der Weg, den jedes Photon von der Probe zu einem der Detektoren nimmt, von der Geräteeinstellung abhängig, die der Anwender gewählt hat. So ist es aufgrund des subjektiven Einflusses möglich, daß der mit der gewählten Gerätekonfiguration für die Photonen vorgegebene Weg richtig, ungünstig oder falsch sein kann.

Eine richtige Einstellung der Gerätekonfiguration ist dann gegeben, wenn Laserlicht mit einer spektralen Zusammensetzung gewählt wurde, die der Anregungsstrahlung für einen in der Probe enthaltenen Farbstoff entspricht, und wenn emissionsseitig die Farbteiler und Filter in den Mikroskopstrahlengang eingeschwenkt worden sind, deren Transmissionspektrum der Emissionswellenlänge des Farbstoffes entspricht.

Eine ungünstige, d. h. zwar funktionsfähige, aber nicht optimale Einstellung ist beispielsweise dann gegeben, wenn eine Laserkonfiguration gewählt wurde, die zwar der Anregungsstrahlung des Farbstoffes entspricht, jedoch Farbteiler oder Filter in den Emissionsstrahlengang eingeschwenkt worden sind, die nur für einen Teil des Emissionsspektrums durchlässig sind. Die Folge ist, daß den jeweiligen Detektor nur schwächere Signale als optimal möglich erreichen. Einen ähnlichen Effekt hat die Auswahl einer Laserwellenlänge, die nicht exakt der Anregungswellenlänge des gewählten Farbstoffes entspricht.

Eine ganz und gar falsche Einstellung ergibt sich dann, wenn entweder anregungsseitig ein falscher Laser und/oder auf der Emissionsseite eine Spiegel- oder Filterkombination mit Transmissionspektrum neben dem Emissionsspektrum gewählt worden ist. Das hat zur Folge, daß das gesamte System kein Bild erzeugen kann.

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde ein Verfahren der vorbeschriebenen Art derart weiterzubilden, daß für den Anwender ohne Vorkenntnisse der optischen Zusammenhänge bei geringem Zeitaufwand die Einstellung einer optimalen Gerätekonfiguration für einen ausgewählten Farbstoff möglich ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Excitationswellenlängen und die Emissionswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in getrennten Datensätzen erfaßt und diese in einem Datenspeicher abgelegt werden. Ebenso werden die mit dem Mikroskop einstellbaren Laserspektren, die auf die Probe zu richten sind, und die mit den vorhandenen Filtern und/oder Spektralteilern erzielbaren Transmissionspektren in Datensätzen erfaßt und

DE 198 29 944 A 1

3

4

diese Datensätze gespeichert.

Erfindungsgemäß werden aus einer rechnerischen Verknüpfung dieser Datensätze Vorgaben für die Konfiguration des Mikroskops ermittelt, indem durch die Verknüpfung des Datensatzes für die Excitationswellenlänge eines vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes mit allen auswählbaren Laserspektren mindestens ein Laserspektrum ausgewählt wird, das der Excitationswellenlänge des vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht. In dieser Weise wird auch durch Verknüpfung der Daten für die Emissionswellenlänge dieses Fluoreszenzfarbstoffes mit den Daten der möglichen Filterkombinationen das Transmissionsspektrum ermittelt, welches der Emissionswellenlänge des vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht.

Damit wird das aus dem Stand der Technik bekannte subjektive Auswählen von Laser- und Transmissionsspektren durch Verfahrensschritte ersetzt, die für jeden Fluoreszenzfarbstoff, dessen Excitations- und Emissionswellenlängen in den betreffenden Datensätzen abgelegt sind, eine objektive Bestimmung und Vorgabe der zugehörigen Mikroskopkonfiguration ermöglichen. Darüber hinaus wird auf diese Weise nicht nur die optimale, sondern auch eine schnellere aufgabenbezogene Einstellung des Mikroskops erzielt, als dies bei einer manuellen Verfahrensweise der Fall sein kann.

In einer Ausgestaltungsvariante der Erfindung werden die Excitationswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in einem ersten Datensatz, die einstellbaren Laserspektren in einem zweiten Datensatz, die Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe in einem dritten Datensatz und die einstellbaren Filter-Transmissionsspektren in einem vierten Datensatz erfaßt und gespeichert.

Im Ergebnis der rechnerischen Verknüpfung des ersten und des zweiten Datensatzes wird mindestens eine Einstellkonfiguration für das Spektrum der Laserstrahlung ermittelt, die der Excitationswellenlänge eines vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht. In gleicher Weise wird im Ergebnis der rechnerischen Verknüpfung des dritten und des vierten Datensatzes mindestens eine Einstellkonfiguration für das Filter-Transmissionsspektrum ermittelt, die der Emissionswellenlänge des vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht.

Die einzelnen Datensätze können zu jeder Zeit ergänzt bzw. berichtigt werden. Zwischen dem ersten und dritten Datensatz besteht insoweit eine Beziehung, als die gespeicherten Daten über die Excitationswellenlängen und die Emissionswellenlängen jeweils demselben Fluoreszenzfarbstoff zuzuordnen sind und jeweils bei Aufruf des Fluoreszenzfarbstoffes zwecks Verknüpfung zur Verfügung stehen.

Eine sehr bevorzugte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß die Daten aller Datensätze jeweils als Kette von Binärdaten erfaßt werden und daß jeder Binärwert einer solchen Kette einem bestimmten Abschnitt $\Delta\lambda$ in ein und demselben Wellenlängenbereich λ_1 bis λ_2 zugeordnet wird. Dabei wird ein Abschnitt $\Delta\lambda$ immer dann durch einen Binärwert "0" definiert, wenn die in diesem Abschnitt $\Delta\lambda$ zu messende Strahlungsintensität unter einem Schwellwert y liegt. Andererseits wird ein Abschnitt $\Delta\lambda$, in dem die Strahlungsintensität über dem Schwellwert y liegt, mit einem Binärwert "1" definiert.

Für die Daten eines zur Beleuchtung der Probe dienenden Laserspektrums bedeutet das, daß alle innerhalb des Wellenlängenbereiches λ_1 bis λ_2 liegenden Abschnitt $\Delta\lambda$ mit einem Binärwert "1" bewertet werden, in denen die Laserstrahlung mit einer über dem Schwellwert y liegenden Intensität auf die Probe gestrahlt wird. Allen anderen $\Delta\lambda$ innerhalb des Wellenlängenbereiches λ_1 bis λ_2 , bei denen die Intensität unter dem Schwellwert y liegt, wird der Binärwert "0" zuge-

ordnet.

Für die Daten der Excitationswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe bedeutet das, daß lediglich die $\Delta\lambda$ innerhalb des Wellenlängenbereiches λ_1 bis λ_2 mit einem Binärwert "1" bewertet werden, bei denen die Intensität des auf die Probe gerichteten Laserlichtes über dem Schwellwert y liegt, bei dem mit Sicherheit eine Anregung des betreffenden Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt. Alle weiteren Teilbereiche $\Delta\lambda$, bei denen die Intensität unter dem Schwellwert y liegt und insofern nicht mit Sicherheit zur Anregung ausreicht, werden mit dem Binärwert "0" bewertet.

Für die Daten der Emissionswellenlängen werden lediglich die $\Delta\lambda$ des Wellenlängenbereiches λ_1 bis λ_2 mit "1" bewertet, für die bei angeregtem Farbstoff eine Intensität zu messen ist, die über dem Schwellwert y liegt.

Bei der Bewertung von Filtern bzw. Filterkombinationen wird nur dem Teilbereich $\Delta\lambda$ ein Binärwert "1" zugeordnet, für den bei einer Strahlungsintensität, die über dem Schwellwert y liegt, die betreffenden Filter bzw. Filterkombinationen transparent sind. Dagegen werden alle anderen Teilbereiche $\Delta\lambda$ mit dem Binärwert "0" bewertet.

Mit dieser Art der Datenerfassung entstehen für alle zu speichernden Informationen Binärwertketten aus einer stets gleich großen Anzahl von Binärwerten. Innerhalb einer jeden Kette ist die Anzahl der nebeneinander liegenden Binärwerte "1" ein Maß für die jeweilige Bandbreite. Der Ort eines Binärwertes "1" bzw. mehrerer nebeneinander liegender Binärwerte "1" ist ein Maß für die Wellenlängen

- die zur Anregung des Farbstoffes geeignet sind (im ersten Datensatz D1),
- mit denen eine Strahlung auf die Probe trifft (im zweiten Datensatz D2),
- mit denen eine Strahlung von der Probe emittiert wird (im dritten Datensatz D3) und
- für die ein Filter bzw. eine Filterkombination durchlässig ist (im vierten Datensatz D4).

Somit sind alle Binärwertketten dahingehend miteinander vergleichbar, ob die in ihnen enthaltenen Binärwerte "1" gleiche oder verschiedene Wellenlängen bzw. gleiche oder verschiedene Spektralbänder repräsentieren.

Wird beispielsweise die Binärwertkette der Excitationswellenlänge eines ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffes (erster Datensatz) mit der Binärwertkette einer ausgewählten Einstellkonfiguration für ein Laserspektrum (zweiter Datensatz) verglichen, so läßt sich aus den Orten der Binärwerte "1" in beiden Binärwertketten erkennen, ob die Bandbreite des Laserspektrums die Bandbreite des Excitationspektrums teilweise, vollständig oder gar nicht überdeckt.

Für die Konfiguration des Mikroskops ist dann lediglich eine Zuordnung der Binärwertketten der beiden Datensätze sinnvoll, in denen sich die Orte der Binärwerte "1" mindestens teilweise, nach Möglichkeit jedoch vollständig überdecken.

Als Bewertungskriterium, ob ein Teilbereich $\Delta\lambda$ mit einem Binärwert "0" oder ein Binärwert "1" bewertet wird, dient die Strahlungsintensität der auf die Probe treffenden Laserstrahlung, wobei bevorzugt der Schwellwert y bei 50% dieser Strahlungsintensität vorgegeben wird.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, daß der Wellenlängenbereich, der der Ermittlung aller Binärwertketten zugrunde zu legen ist, bei $\lambda_1=300\text{nm}$ beginnt und bei $\lambda_2=700\text{nm}$ endet. Weiterhin ist bevorzugt vorgesehen, daß jedem Binärwert "0" oder "1" ein Teilbereich $\Delta\lambda$ zugeordnet wird, der einer Bandbreite von 0,1nm entspricht.

Zur rechnerischen Auswahl eines geeigneten Laserspek-

DE 198 29 944 A 1

5

trums ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß die Binärwertkette aus dem ersten Datensatz, die der Excitationswellenlänge eines vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht, nacheinander mit allen Binärwertketten des zweiten Datensatzes durch eine "AND"-Funktion logisch verknüpft wird. Aus dieser Verknüpfung entstehen wiederum Binärwertketten, von denen die Binärwertkette ermittelt und als Ergebnis registriert wird, in der die meisten nebeneinander liegenden Binärwerte "1" auftreten. Zur Konfiguration des Mikroskops wird nun das Laserspektrum vorgegeben, dessen Binärwertkette (aus dem zweiten Datensatz) zu dem registrierten Ergebnis, d. h. zu der Ergebnis-Binärwertkette mit den meisten nebeneinander liegenden Binärwerten "1" geführt hat.

Zur Auswahl eines geeigneten Filter-Transmissionsspektrums wird die Binärwertkette aus dem dritten Datensatz, die der Emissionswellenlänge des vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht, nacheinander mit allen Binärwertketten des vierten Datensatzes durch "AND"-Funktion verknüpft. Auch hierbei entstehen im Ergebnis wieder Binärwertketten, von denen diejenigen ausgewählt werden, in denen mindestens ein Binärwert "1" auftritt. Von diesen Binärwertketten wird diejenige bestimmt und als Ergebnis registriert, bei der die meisten nebeneinander liegenden Binärwerte "1" auftreten. Zur Konfigurationseinstellung des Mikroskops wird nun die Filterkombination vorgegeben, deren Binärwertkette (aus dem vierten Datensatz) zu der registrierten Ergebnis-Binärwertkette geführt hat.

Alternativ zur Erfassung der Daten in Form von Binärwertketten und zur Ermittlung einer optimalen Konfiguration des Mikroskops durch "AND"-Verknüpfung dieser Binärwertketten ist es denkbar, analog zur Berechnung von Schwingkreisen in der Elektrotechnik das Laserlicht mit einer diskreten Wellenlänge als Eingangsgröße für einen Schwingkreis zu werten. Dabei können die Filter beispielsweise durch RC-Glieder simuliert werden. Durch Variationen von R (dem "Widerstandswert") und C (der "Kapazität") wird die Qualität einer Fotoemission für jede Konfiguration des Laser-Scan-Mikroskops errechnet und bewertet. Das Ergebnis mit der höchsten Qualität wird dann als Konfiguration für die Geräteeinstellung vorgegeben. Auf diese Weise können alle Kombinationen von Lichtwegen erfaßt und als Ergebnis die entsprechenden Filter bzw. Farberteiler in den Mikroskopstrahlengang eingeschwenkt werden.

Die Aufgabe der Erfindung wird weiterhin gelöst durch ein konfokales Lasermikroskop mit einem Lasermodul zur Erzeugung einer Laserstrahlung, die auf eine Probe mit mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff gerichtet ist und deren Spektrum veränderbar ist und das über Filter unterschiedlicher Transmissionsspektren verfügt, die wahlweise in dem Strahlengang des von der Probe reflektierten und/oder emittierten Lichtes einschwenkbar sind.

Dabei ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß das Lasermodul und die Filter mit ansteuerbaren Stelleinrichtungen verbunden sind, daß ein Datenspeicher für Datensätze von Excitations- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe, für einen Datensatz von verschiedenen einstellbaren Laserspektren und für einen Datensatz von verschiedenen einstellbaren Transmissionsspektren vorgesehen ist und daß weiterhin eine Rechenschaltung zur Verknüpfung dieser Datensätze vorhanden ist, deren Ausgang über eine Ansteuer-einrichtung mit den Stelleinrichtungen verbunden ist.

In der Rechenschaltung ist eine "AND"-Verknüpfung der Daten für die Excitationswellenlängen mit den Daten der möglichen Laserspektren und eine "AND"-Verknüpfung der Daten der Emissionswellenlängen mit den Daten der möglichen Transmissionsspektren vorgesehen.

In Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Lasermikro-

6

skops kann das Lasermodul mehrere Ein- oder Mehrlinienlaser aufweisen, die separat ansteuerbar sind und/oder denen ein ansteuerbarer und durchstimmbarer Spektralfilter (AOTF) und/oder ein ansteuerbarer akusto-optischer Modulator (AOM) nachgeschaltet sind, die als Stelleinrichtungen dienen und durch deren Ansteuerung verschiedene Laserspektren auswählbar sind.

Weiterhin ist vorgesehen, daß mehrere Linienfilter und/oder Spektralteiler auf Filterrädern angeordnet und durch Drehung dieser Räder gegeneinander austauschbar sind.

Die Erfindung soll nachfolgend an Hand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert werden. In den zugehörigen Zeichnungen zeigen

Fig. 1 ein Beispiel für die Bandbreite einer auf die Probe gerichteten Laserstrahlung einschließlich der zugehörigen Binärwertkette,

Fig. 2 das Beispiel einer Binärwertkette für einen ausgewählten Fluoreszenzfarbstoff sowohl für die Excitationswellenlänge als auch für die Emissionswellenlänge,

Fig. 3 ein Beispiel für das Transmissionsspektrum eines Filters mit zugehöriger Binärwertkette,

Fig. 4 ein Beispiel für die logische Verknüpfung der Spektren aus Fig. 1 und Fig. 2,

Fig. 5 ein Beispiel für die logische Verknüpfung der Spektren aus Fig. 2 und Fig. 3.

Fig. 6 die prinzipielle Darstellung einer Mikroskopanordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

In Fig. 1 ist ein Diagramm dargestellt, auf dessen Abszisse der Wellenlängenbereich $\lambda_1=300\text{nm}$ bis $\lambda_2=700\text{nm}$ abgetragen ist. Diesem Bereich ist eine Binärwertkette zugeordnet, in der jeweils ein Binärwert "0" oder "1" einem Teilbereich $\Delta\lambda$ entspricht.

Auf der Ordinate dieses Diagramms ist die Strahlungsintensität in Prozent angegeben. Von den den einzelnen Teilbereichen $\Delta\lambda$ zugeordneten Binärwerten werden nur die Binärwerte mit "1" definiert, bei denen eine Strahlung vorhanden ist und diese Strahlung eine Intensität aufweist, die über einen Schwellwert y hinausgeht, wobei der Schwellwert y mit 50% der auf die Probe treffenden Intensität vorgegeben ist.

Im Ausführungsbeispiel handelt es sich um die Strahlung eines Einlinienlasers mit einer Bandbreite, die einem Teilbereich $\Delta\lambda$ entspricht, so daß hier lediglich ein Teilbereich $\Delta\lambda$ mit dem Binärwert "1" zu bewerten ist.

In Fig. 2 ist für denselben Wellenlängenbereich λ_1 bis λ_2 eine Bewertung der Excitations- und Emissionswellenlängen eines ausgewählten, nicht näher bezeichneten Fluoreszenzfarbstoffes dargestellt.

Hier ist ebenfalls jedem Teilbereich $\Delta\lambda$ ein Binärwert "0" oder "1" zugeordnet. Die Teilbereiche $\Delta\lambda$, in denen die Strahlungsintensität, die erforderlich ist, um den Farbstoff zur Fluoreszenz anzuregen, unter dem Schwellwert y liegt, wird dabei stets mit dem Binärwert "0" definiert, während jeder Teilbereich $\Delta\lambda$, bei dem die zur Anregung des Farbstoffes erforderliche Strahlungsintensität über dem Schwellwert y liegt, mit einem Binärwert "1" bewertet wird. Die Anzahl der nebeneinander liegenden Binärwerte "1" ist dabei ein Maß für die Bandbreite, innerhalb derer, die vorgegebene Strahlungsintensität vorausgesetzt, eine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes möglich ist.

Analog hierzu ist ebenfalls in Fig. 2 die Emissionsbandbreite desselben Fluoreszenzfarbstoffes bewertet worden. Wie bei der Anregungsstrahlung ist auch hier die Anzahl der nebeneinanderliegenden Binärwerte "1", die der Emissionsstrahlung zugeordnet sind, ein Maß für die Bandbreite der Emissionsstrahlung.

In gleicher Weise ist in Fig. 3 das Transmissionsspektrum eines Filters, ebenfalls wieder für denselben Wellenlängen-

DE 198 29 944 A 1

7

bereich λ_1 bis λ_2 , dargestellt. Hier sind die Teilbereiche $\Delta\lambda$ mit einem Binärwert "1" definiert, bei denen die Strahlung mit einer Intensität den Filter passiert, die über dem Schwellwert y liegt. Die Anzahl der nebeneinander liegenden Binärwerte "1" ist ein Maß für die Filterbandbreite.

In jedem dieser Diagramme nach den Fig. 1 bis Fig. 3 entspricht der Ort des ersten Binärwertes der Wellenlänge $\lambda_1=300\text{nm}$, der Ort des letzten Binärwertes der Wellenlänge $\lambda_2=700\text{nm}$. Da alle Binärwertketten die gleiche Anzahl Teilbereiche $\Delta\lambda$ haben, sind auch die Orte aller dazwischen liegenden Binärwerte definiert, woraus sich die Vergleichbarkeit der Daten für das Laserspektrum, für die Excitations- und Emissionswellenlänge eines Fluoreszenzfarbstoffes sowie für die Filtertransmissionsspektren ergibt.

Ein Beispiel für einen solchen Vergleich und die erfindungsgemäße rechnerische Verknüpfung der für die einzelnen Wellenlängen bzw. Einstellkonfigurationen gespeicherten Daten ist in Fig. 4 dargestellt.

In Fig. 4 sind das Diagramm nach Fig. 1 und das Diagramm mit der Excitationswellenlänge aus Fig. 2 übereinander gelegt. Unterhalb des Diagramms sind die zugehörigen Binärwertketten aus Fig. 1 und Fig. 2 dargestellt und miteinander durch eine "AND"-Funktion verknüpft. Das Ergebnis der Verknüpfung ist ebenfalls eine Binärwertkette, die jedoch nur an den Positionen für Teilbereiche $\Delta\lambda$ einen Binärwert "1" aufweist, für die sowohl in der Binärwertkette nach Fig. 1 als auch in der Binärwertkette nach Fig. 2 ein Binärwert "1" definiert ist.

Damit ist dem Ergebnis zu entnehmen, daß mit der ausgewählten Spektraleigenschaft der Laserstrahlung eine Anregung des vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes bei ausreichender Strahlungsintensität erfolgen kann. Diese Konfiguration wird zur Vorgabe vorgesehen, womit eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Mikroskopie der Probe erfüllt ist.

Alle Einstellkonfigurationen im Hinblick auf Laserspektren, die im Ergebnis der Verknüpfung ihrer Binärwertkette mit der Binärwertkette eines Fluoreszenzfarbstoffes eine Kette ergeben, in der kein Binärwert "1" enthalten ist, sind für die Konfiguration des Mikroskopes nicht geeignet.

Fig. 5 zeigt die analoge Verfahrensweise bei der Ermittlung einer Einstellkonfiguration für ein Filter-Transmissionsspektrum, das auf die Emissionswellenlänge eines Fluoreszenzfarbstoffes nach Fig. 2 abgestimmt ist. Es ist zu erkennen, daß die Verknüpfung der Binärdaten für das Emissionsspektrum eines ausgewählten Farbstoffes mit den Binärdaten eines Filters A zum Ergebnis führt, daß Filter A nicht geeignet ist, da in der als Ergebnis der Verknüpfung dargestellten Binärwertkette kein Binärwert "1" auftritt und somit die Emissionsstrahlung den Filter nicht passieren kann. Anders dagegen bei der Verknüpfung der Binärdaten des ausgewählten Farbstoffes mit den Daten für den Filter B; Die nebeneinanderliegenden Binärwerte "1" in der Ergebniskette der Verknüpfung weisen aus, daß diese Konfiguration geeignet ist.

In Fig. 6 ist beispielhaft ein konfokales Lasermikroskop zur Ausübung des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt. Darin ist ein Lasermodul 1 vorgesehen, das mit den Lasern 2, 3 und 4 zur Erzeugung von Laserlicht der Wellenlängen 633 nm, 543 nm und 488 nm für den sichtbaren Bereich ausgestattet ist. Die von den Lasern 2, 3 und 4 ausgehende Strahlung wird über mehrere Strahlvereinigungen 5, ein AOTF 6 und eine Faser 7 in eine Scan-Einrichtung 8 eingekoppelt, die mit einer in den Koordinaten x und y strahlableitenden Einheit 9 ausgestattet ist.

In einem zweiten Lasermodul 10 ist ein UV-Laser vorgesehen, dessen Licht über ein AOTF 11 und eine Lichtleitfaser 12 in die Scan-Einrichtung 8 eingekoppelt wird.

8

In beiden Strahlengängen sind den Lichtleitfasern 7 und 12 Kollimationsoptiken 13 nachgeordnet, deren Abstände zum jeweiligen Faserende veränderbar sind und die zu diesem Zweck mit einer ansteuerbaren Stellanrichtung (zeichnerisch nicht dargestellt) gekoppelt sind.

Von der strahlableitenden Einrichtung 9 wird die Laserstrahlung durch ein Scan-Objektiv 14 in den Strahlengang des vereinfacht dargestellten Mikroskops 15 eingekoppelt und hier auf eine Probe 16 gerichtet, die einen fluoreszierenden Farbstoff enthält oder auf die ein solcher Farbstoff aufgebracht worden ist. Auf dem Weg zur Probe passiert die Laserstrahlung eine Tubuslinse 17, einen Strahlteiler 18 und das Mikroskopobjektiv 19.

Das von dem jeweils beaufschlagten Ort der Probe reflektierte und/oder emittierte Licht gelangt durch das Mikroskopobjektiv 19 zurück zur strahlableitenden Einrichtung 9, passiert danach einen Strahlteiler 20 und wird mit Hilfe der Abbildungsoptik 21 nach Aufzweigung in mehrere Detektionskanäle 22 auf Photomultiplier 23 gerichtet, von denen jeweils einer einem der Detektionskanäle 22 zugeordnet ist. Zum Zweck der Aufzweigung in die einzelnen Detektionskanäle 22 wird das Licht beispielhaft von einem Umlenkprisma 24 auf dichroitische Strahlteiler 25 gerichtet. In jedem Detektionskanal 22 sind sowohl in Richtung als auch senkrecht zur Strahlungsrichtung verstellbare und in ihren Durchmessern veränderbare Pinholes 26 sowie Emissionsfilter 27 vorgesehen.

Die Ausgänge der Photomultiplier 23 führen zu den Signaleingängen einer Auswerteschaltung 28, die ihrerseits mit einer Ansteuereinrichtung 29 verbunden ist. Die Ausgänge der Ansteuereinrichtung 29 sind mit den Signaleingängen der Lasermodule 1 und 10 sowie mit Signaleingängen der Stellanrichtungen zur Beeinflussung der Position von optischen Elementen bzw. Baugruppen, wie beispielsweise der Position der Kollimationsoptiken 13, der Pinholes 26 u. a. verbunden (im Detail nicht dargestellt).

Beispielhaft ist die in die Scan-Einrichtung 8 eingekoppelte Laserstrahlung durch einen Strahlteiler 30 verzweigt, wobei einer der Zweige auf einen optoelektronischen Empfänger 31 gerichtet ist, dem mehrere auf Filterrädern angeordnete und durch Drehung der Filterräder gegeneinander austauschbare Linienfilter 32 und ebenso gegeneinander austauschbare Neutralfilter 33 vorgeordnet sind. Der Ausgang des Empfängers 31 liegt ebenfalls an einem Signaleingang der Auswerteschaltung 28. Die Filterräder, auf denen die Linienfilter 32 und die Neutralfilter 33 angeordnet sind, sind mit Stellanrichtungen gekoppelt, deren Steuereingänge mit Signalausgängen der Ansteuereinrichtung 29 verbunden sind (zeichnerisch nicht dargestellt).

Die Auswerteschaltung ist außerdem mit einem Datenspeicher 34 verbunden, in welchem die Datensätze D1 bis D4 von Excitations- und Emissionswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, von Laserspektren und von einstellbaren Transmissionsspektren in jeweils einem gesonderten Datensatz abrufbar gespeichert sind.

In der Auswerteschaltung 28 ist eine Rechenschaltung zu der weiter oben bereits dargestellten erfindungsgemäßen Verknüpfung der Daten des ersten Datensatzes D1 mit dem zweiten Datensatz D2 und der Daten des dritten Datensatzes D3 mit dem vierten Datensatz D4 vorgesehen. Das jeweilige Rechenergebnis wird in der ebenfalls bereits beschriebenen Weise in Form von Stellbefehlen über die Ansteuereinrichtung 29 an die beiden AOTF 6 und 11 sowie an die Stellanrichtungen, mit denen die Emissionsfilter 27 und beispielhaft auch die in Lage und Durchmesser veränderbaren Pinholes 26 verbunden sind.

DE 198 29 944 A 1

9

Bezugszeichenliste

1	Lasermodul	
2-4	Laser	
5	Strahlereiniger	5
6	AOTF	
7	Lichtleitfaser	
8	Scan-Einrichtung	
9	strahlableitende Einrichtung	
10	Lasermodul	10
11	AOTF	
12	Faser	
13	Kollimationsoptik	
14	Scanobjektiv	
15	Mikroskop	15
16	Probe	
17	Tubuslinse	
18, 20	Strahlteiler	
19	Mikroskopobjektiv	
21	Abbildungsoptik	20
22	Detektionskanäle	
23	Photo-Multiplier (PMT)	
24	Umlenkprisma	
25	dichroitische Strahlteiler	25
26	Pinholes	
27	Emissionsfilter	
28	Auswerteeinheit	
29	Ansteuereinrichtung	
30	Strahlteiler	
31	optoelektronischer Empfänger	30
32	Linienfilter	
33	Neutralfilter	
34	Datenspeicher	

Patentansprüche

35

1. Verfahren zur Konfiguration eines konfokalen Lasermikroskops vor oder während der Untersuchung einer Probe, die mindestens einen Fluoreszenzfarbstoff enthält oder auf die mindestens ein Fluoreszenzfarbstoff aufgebracht ist, wobei ein Laserspektrum ausgewählt und auf die Probe gerichtet wird, das der Excitationswellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht und optische Filter zum Einschwenken in den Mikroskopstrahlengang ausgewählt werden, deren Transmissionsspektren der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes entsprechen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Excitationswellenlängen und die Emissionswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die einstellbaren Laserspektren und die einstellbaren Filter-Transmissionsspektren in getrennten Datensätzen erfaßt und in einem Datenspeicher abgelegt werden und aus einer rechnerischen Verknüpfungen der Datensätze Vorgaben für die Konfiguration des Mikroskopes ermittelt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Excitationswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen in einem ersten Datensatz (D1), die einstellbaren Laserspektren in einem zweiten Datensatz (D2), die Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe in einem dritten Datensatz (D3) und die einstellbaren Filter-Transmissionsspektren in einem vierten Datensatz (D4) erfaßt und gespeichert werden, **dadurch**

10

stoffes entspricht und

– daß durch rechnerische Verknüpfung des dritten und des vierten Datensatzes (D4) mindestens eine Einstellkonfiguration für das Filter-Transmissionsspektrum ermittelt wird, die der Emissionswellenlänge des vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Daten aller Datensätze jeweils als Kette von Binärwerten erfaßt werden und jeder Binärwert einer Kette einem bestimmten Abschnitt $\Delta\lambda$ eines Wellenlängenbereiches λ_1 bis λ_2 zugeordnet wird, wobei ein Binärwert "0" stets einem Abschnitt $\Delta\lambda$ zugeordnet wird, bei dem eine vorgegebene Strahlungsintensität unter einem Schwellwert y liegt und ein Binärwert "1" stets einem Abschnitt $\Delta\lambda$ zugeordnet wird, bei dem diese Strahlungsintensität über dem Schwellwert y liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Strahlungsintensität der auf die Probe treffenden Laserstrahlung zugrunde gelegt und der Schwellwert y bei 50% dieser Strahlungsintensität vorgegeben wird.

5. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Wellenlängenbereich $\lambda_1=300\text{nm}$ bis $\lambda_2=700\text{nm}$ beträgt und jeder Binärwert einem $\Delta\lambda=0,1\text{nm}$ entspricht.

6. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Auswahl eines Laserspektrums

– die Binärwertkette aus dem ersten Datensatz (D1), die der Excitationswellenlänge eines vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht, nacheinander mit allen Binärwertketten des zweiten Datensatzes (D2) durch eine "AND"-Funktion verknüpft wird,

– daß aus den dabei entstehenden Binärwertketten die Binärwertketten ermittelt werden, in denen mindestens einmal ein Binärwert "1" auftritt,

– daß davon die Binärwertkette bestimmt und als Ergebnis registriert wird, in der die meisten nebeneinanderliegenden Binärwerte "1" auftreten und

– daß das Laserspektrum zur Konfiguration des Mikroskops vorgegeben wird, dessen Binärwertkette zu dem registrierten Ergebnis geführt hat.

7. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Auswahl eines Filter-Transmissionsspektrums

– die Binärwertkette aus dem dritten Datensatz (D3), die der Emissionswellenlänge eines vorgegebenen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht, nacheinander mit allen Binärwertketten des vierten Datensatzes (D4) durch eine "AND"-Funktion verknüpft wird,

– daß aus den dabei entstehenden Binärwertketten die Binärwertketten ermittelt werden, bei denen mindestens ein Binärwert "1" auftritt,

– daß davon die Binärwertkette bestimmt und als Ergebnis registriert wird, bei der die meisten nebeneinanderliegenden Binärwerte "1" auftreten und

– daß das Filtertransmissionsspektrum zur Konfiguration des Mikroskops vorgegeben wird, dessen

*b209W1âp<Ä88< das zweite Datensatz (D2) wird durch das

DE 198 29 944 A 1

11

12

Probe (16) mit mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff
gerichtet und deren Spektrum veränderbar ist und mit
Filtern unterschiedlicher Transmissionsspektren, die
wahlweise in den Strahlengang des von der Probe (16)
reflektierten und/oder emittierten Lichtes einschwenk- 5
bar sind, dadurch gekennzeichnet, daß das Lasermodul
(1) und die Filter mit ansteuerbaren Stalleinrichtungen
verbunden sind, daß ein Datenspeicher (34) für Daten-
sätze (D1, D2, D3, D4) von Excitations- und Emissi- 10
onswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe;
von Laserspektren und von einstellbaren Transmissi-
onsspektren vorgesehen ist und daß eine Rechenschal-
tung zur Verknüpfung der Datensätze vorhanden ist,
deren Ausgang über eine Ansteuereinrichtung (29) mit 15
den Stalleinrichtungen verbunden ist.

9. Konfokales Lasermikroskop nach Anspruch 8, da-
durch gekennzeichnet, daß in der Rechenschaltung
eine Verknüpfung der Datensätze der Exzitationswel-
lenlängen mit den Datensätzen der einstellbaren Laser- 20
spektren und eine Verknüpfung der Datensätze der
Emissionswellenlängen mit den Datensätzen der ein-
stellbaren Transmissionsspektren, jeweils nach einer
"AND"-Funktion, vorgesehen sind.

10. Konfokales Lasermikroskop nach Anspruch 8 oder
9, dadurch gekennzeichnet, daß im Lasermodul (1) 25
mehrere Ein- oder Mehrlinienlaser (2, 3, 4) vorgesehen
sind, denen ein abstimmbarer optischer Filter (6, 11)
und/oder ein ansteuerbarer optischer Modulator zur
Einstellung verschiedener Laserspektren nachgeschal- 30
tet sind.

11. Konfokales Lasermikroskop nach einem der An-
sprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere
auf Filterrädern angeordnete und durch Drehung der
Filterräder gegeneinander austauschbare Linienfilter
und/oder mehrere auf Teilerrädern angeordnete und 35
durch Drehung der Teilerräder gegeneinander aus-
tauschbare Spektralteiler vorgesehen sind, wobei die
Filterräder und die Teilerräder jeweils mit elektro-me-
chanisch ansteuerbaren Stalleinrichtungen gekoppelt
sind. 40

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:

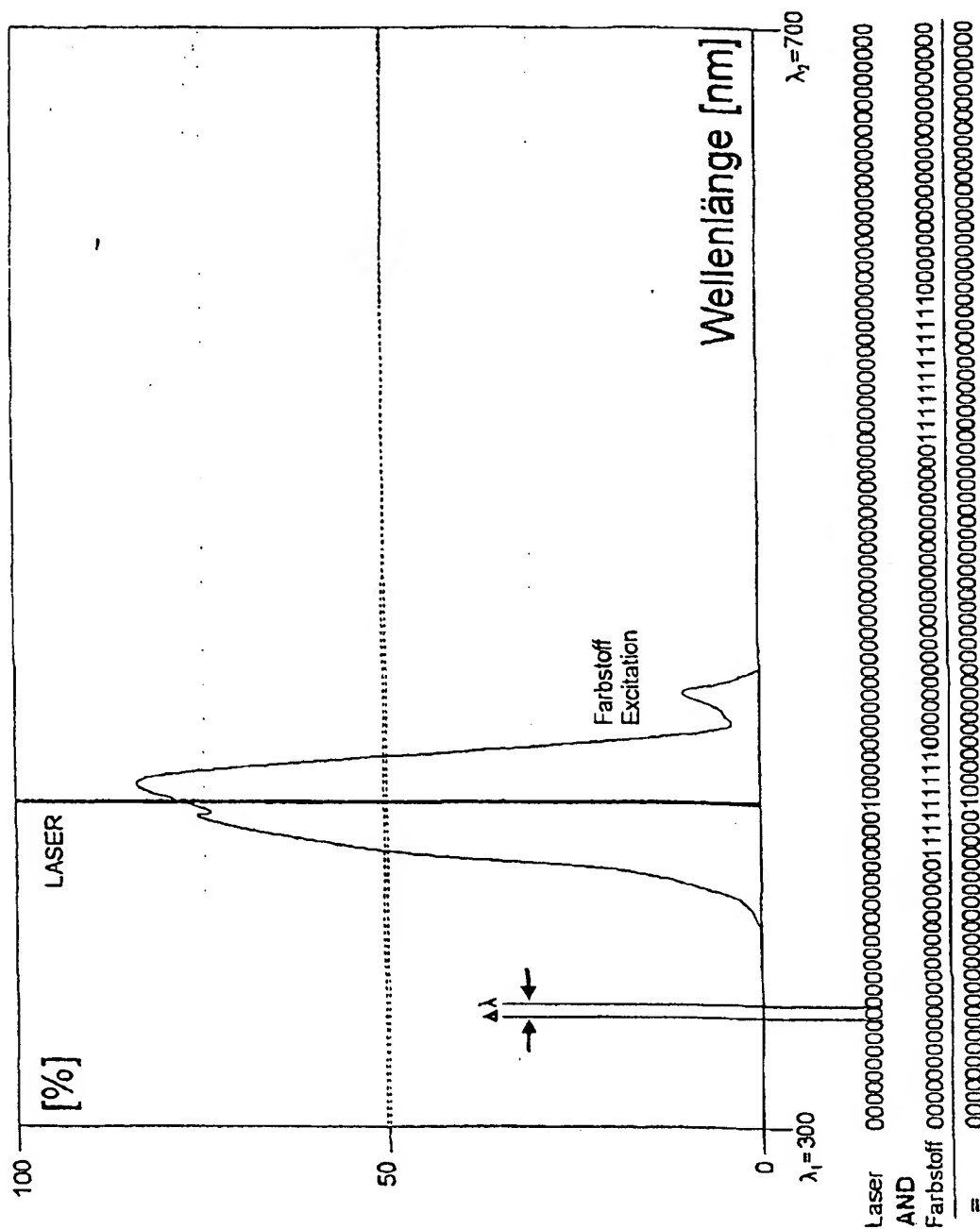
Int. Cl.⁷;

Offenlegungstag:

DE 198 29 944 A1

G 02 B 21/16

5. Januar 2000



Ergebnis > 0 => geeignet

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:
Int. Cl.⁷:
Offenlegungstag:

DE 198 29 944 A1
G 02 B 21/16
5. Januar 2000

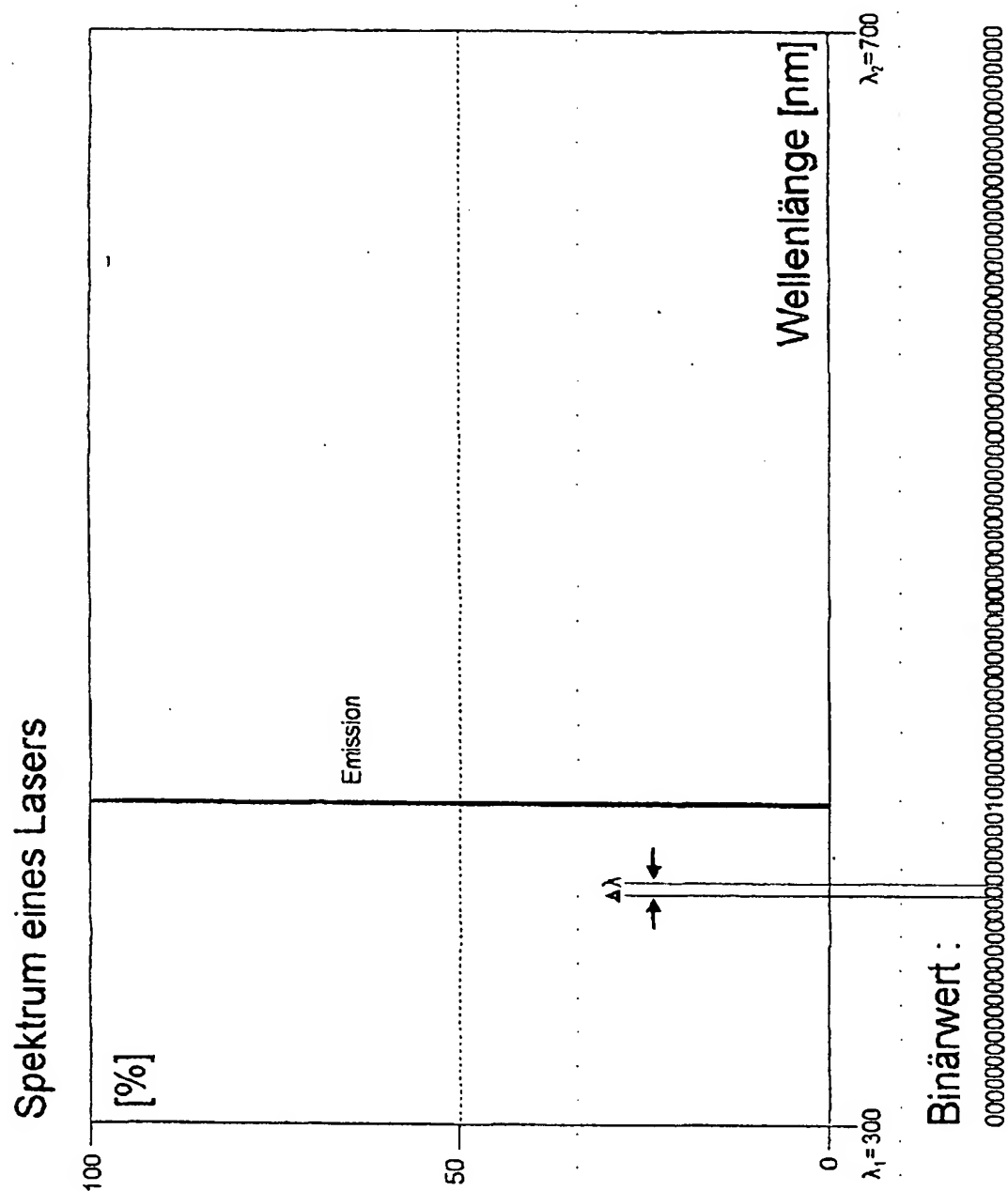


Fig. 1

ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer:
Int. Cl.⁷:
Offenlegungstag:

DE 198 29 844 A1
G 02 B 21/16
5. Januar 2000

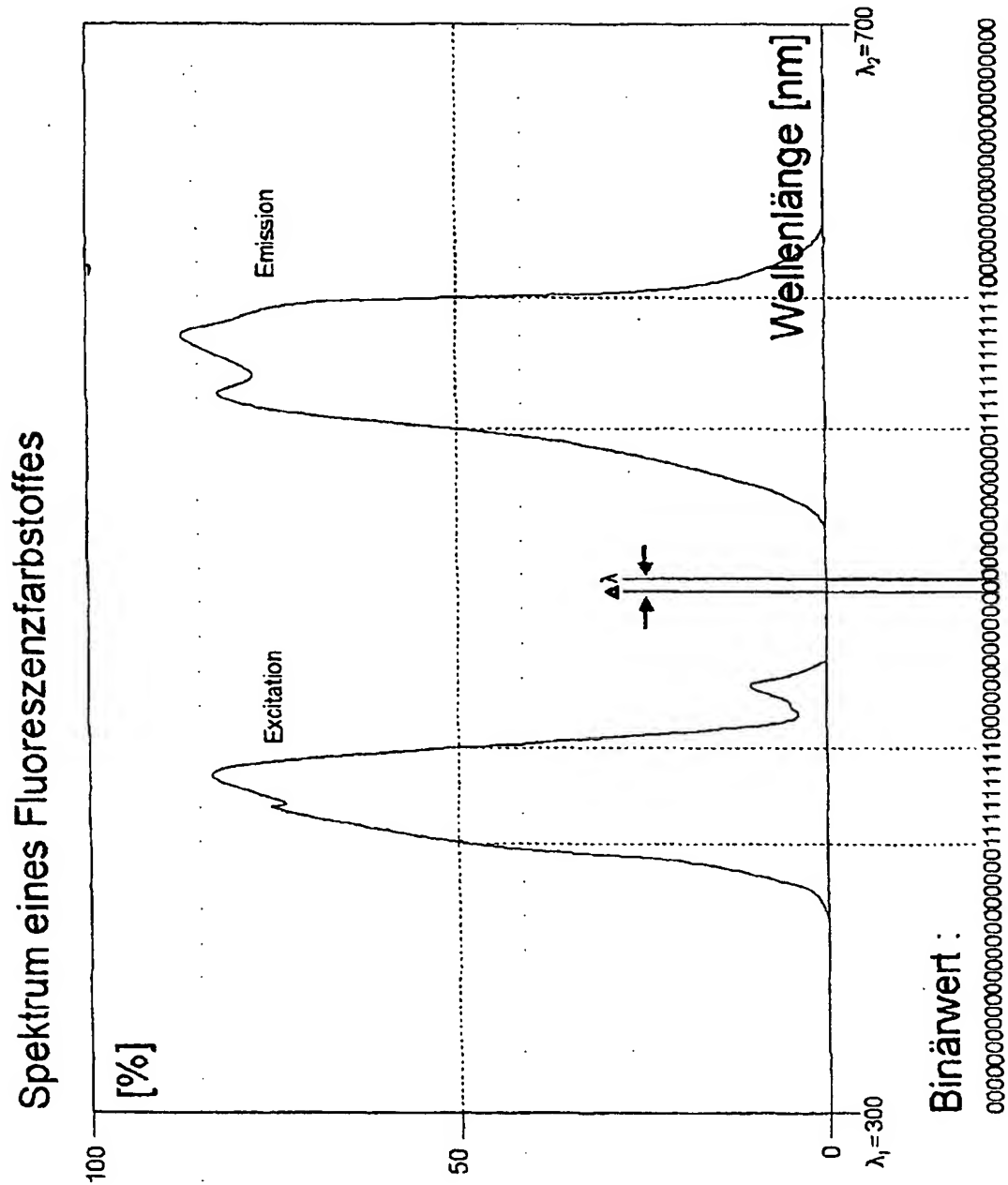


Fig. 2

ZEICHNUNGEN SEITE 4

Nummer:

Int. Cl.7:

Offenlegungstag:

DE 198 29 944 A1

G 02 B 21/16

5. Januar 2000

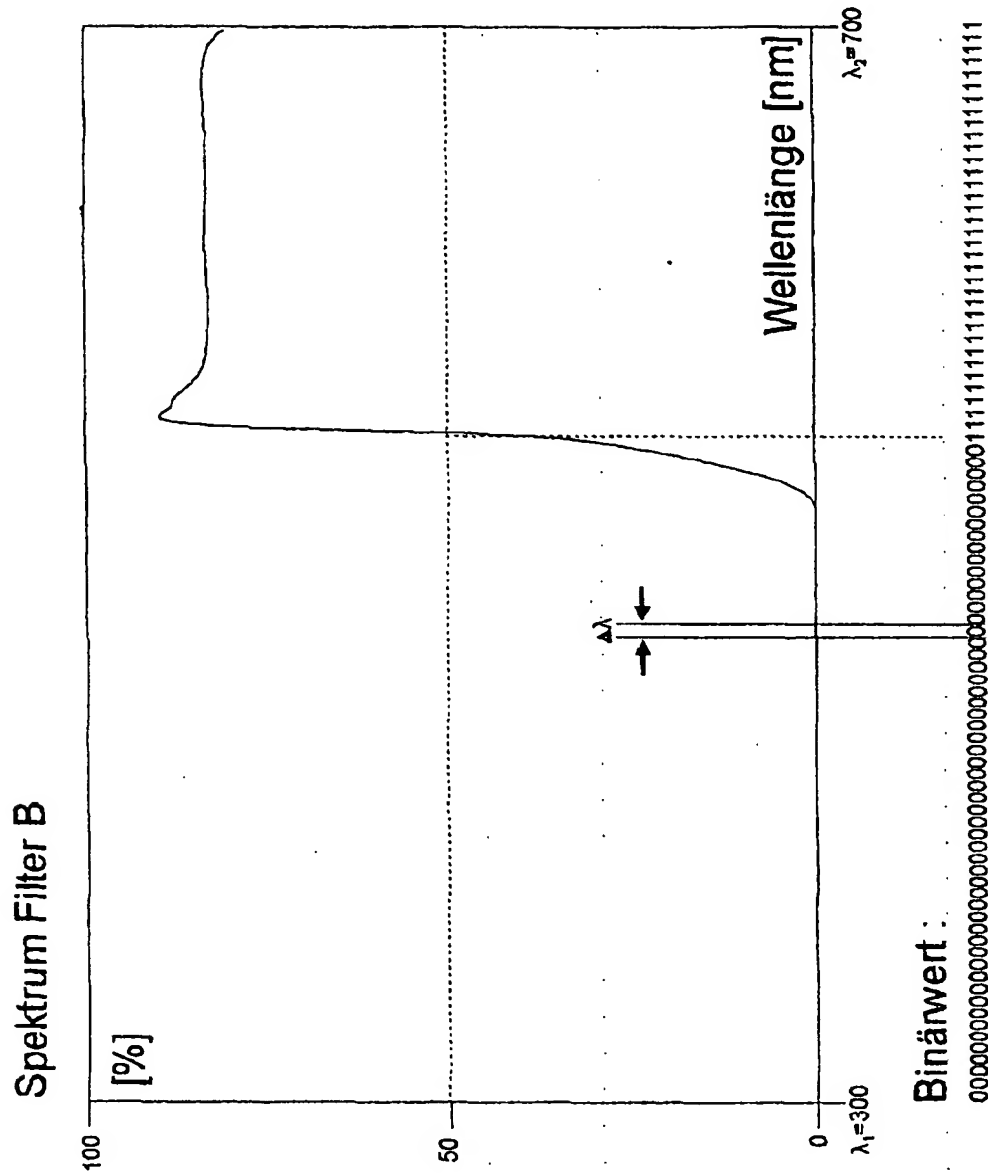


Fig. 3

ZEICHNUNGEN SEITE 5

Nummer:

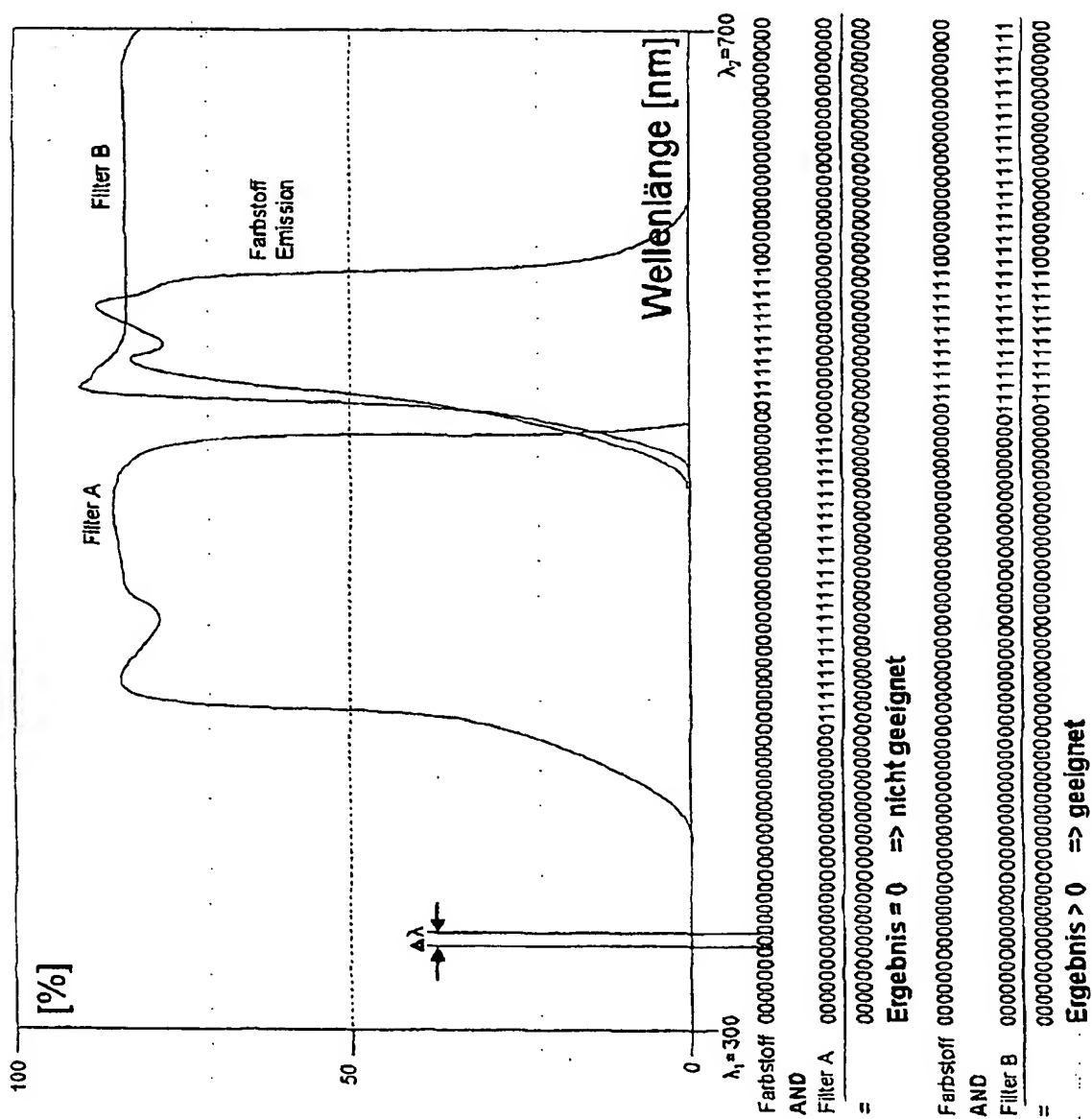
Int. Cl.⁷:

Offenlegungstag:

DE 198 29 944 A1

G 02 B 21/16

5. Januar 2000



ZEICHNUNGEN SEITE 6

Nummer:

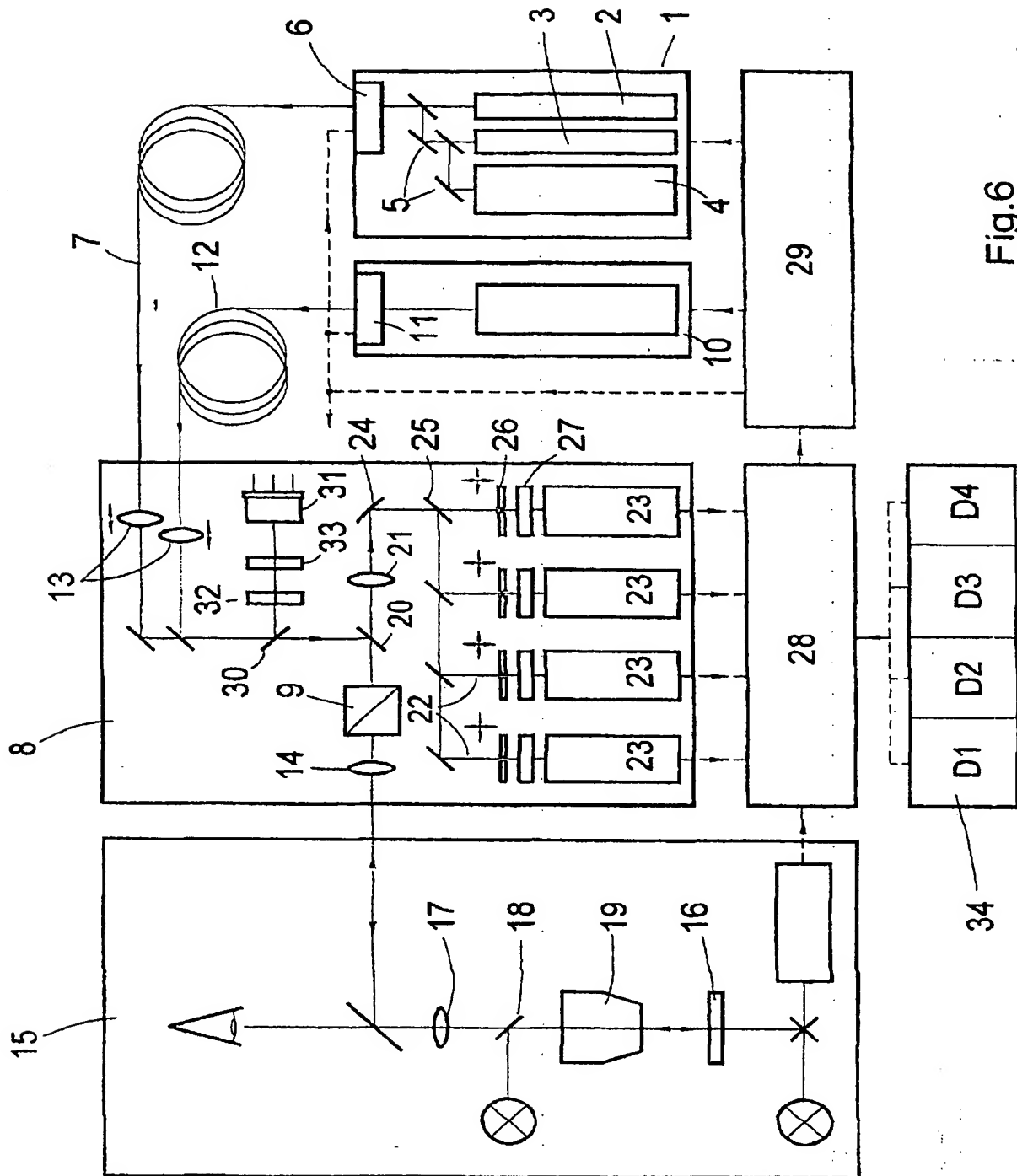
Int. Cl.7:

Offenlegungstag:

DE 198 29 944 A1

G 02 B 21/16

5. Januar 2000



Process and arrangement for the device configuration of confocal microscopes

Patent Number: ☐ US6300639
Publication date: 2001-10-09
Inventor(s): WIEDERHOEFT HOLGER (DE)
Applicant(s): ZEISS CARL JENA GMBH (US)
R requested Patent: ☒ DE19829944
Application Number: US19990298760 19990423
Priority Number(s): DE19981029944 19980704
IPC Classification: G01N21/64
EC Classification: G02B21/00M4A, G02B21/16
Equivalents: ☐ JP2000039563

Abstract

A process for the device configuration of confocal microscopes, preferably of laser scanning microscopes is disclosed, in which laser light with one or more spectral lines is generated and directed on a specimen which contains a fluorescent dye or on which a fluorescent dye has been applied. In this connection, the excitation wavelengths and the emission wavelengths of different fluorescent dyes are recorded in separate data records and these data records are stored in a data storage. The laser spectra which are adjustable with the microscope and which are to be directed onto the specimen and the transmission spectra which can be achieved with the provided filters are likewise recorded in data records and these data records are stored. Presets for the configuration of the microscope are determined from a computational linking of these data records

Data supplied from the esp@cenet database - l2